

DIALOG(R)File 351: Derwent WPI  
(c) 2007 The Thomson Corporation. All rights reserved.

0000578284

WPI Acc no: 1973-64840U/197343

**Calcium phosphate gels - mixed types for vaccine bases**

Patent Assignee: INST PASTEUR (INSP)

Inventor: RELYVELD E H

Patent Family ( 14 patents, 10 countries )							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
NL 197304219	A	00000000				197343	B
BE 797300	A	00000000				197343	E
DE 2316911	A	00000000	DE 2316911	A	19730404	197346	E
FR 2181426	A	19740111				197405	E
JP 49013322	A	19740205				197415	E
US 3925545	A	19751209	US 1973342932	A	19730320	197552	E
GB 1422973	A	19760128				197605	E
AT 197302871	A	19760215				197610	E
CH 579630	A	19760915				197642	E
US 4016252	A	19770405	US 1975639926	A	19751211	197715	E
CA 1034496	A	19780711				197830	E
CA 1042793	A	19781121				197849	E
DE 2316911	B	19790315				197912	E
JP 1980049573	B	19801211				198103	E

Priority Applications (no., kind, date): FR 197212036 A 19720406

Patent Details					
Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes
BE 797300	A	FR			
CH 579630	A	DE			
CA 1034496	A	EN			
CA 1042793	A	EN			

#### Alerting Abstract NL A

The gels are prep'd. by mixing CaCl<sub>2</sub> and sec. sodium phosphate in 0.01-0.50M concn., rapidly, in equimolar proportions at ambient temp. The mixing must be completed within 3 mins., pref. 30 sec., and is facilitated by efficient stirring. The pH is immediately (30-

90 sec.) adjusted to 6.8-7.2, and the gel washed free from phosphate ions by decantation with 0.4-0.9% NaCl. It is then sterilised and the pH readjusted. Antigens may be adsorbed onto the prepd. gel, or added during the pptn. The gel approximates to  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaHPO}_4$ .

**Title Terms /Index Terms/Additional Words:** CALCIUM; PHOSPHATE; GEL; MIX; TYPE; VACCINE; BASE

### Class Codes

International Patent Classification					
IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A61K-039/00			Main		"Version 7"
A61K-039/02; A61K-039/06; A61K-039/12; A61K-039/16; A61K-047/00; C12K-005/00			Secondary		"Version 7<

US Classification, Issued: 424092000, 424088000, 424089000, 424088000, 424089000, 424092000

File Segment: CPI

DWPI Class: B06; D16

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V; B05-B02A; B12-M03; D05-H07

### Chemical Indexing

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M902 M421 M431 M782 P210 P434 R022 V270 V280

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* M902 A220 A940 B115 B701 B713 B720 B815 B819 B831 C101 C108 C802 C804

C805 C807 M411 M431 M782 P210 P434 R022

\*03\* M903 A200 A220 A940 A990 B115 B701 B713 B720 B815 B819 B831 C101 C108

C802 C804 C805 C807 M411 M431 M782 P210 P211 P434 R022

? s pn=fr 2466991

S2 1 PN=FR 2466991

? t s2/9/1

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(A n'utiliser que pour  
le classement et les  
commandes de reproduction).

**2.181.426**

②1 N° d'enregistrement national :  
(A utiliser pour les paiements d'annuités,  
les demandes de copies officielles et toutes  
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

**72.12036**

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

- ②2 Date de dépôt ..... 6 avril 1972, à 13 h 54 mn.  
④1 Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 49 du 7-12-1973.
- ⑤1 Classification internationale (Int. Cl.) C 12 k 5/00/C 12 k 1/00.
- ⑦1 Déposant : INSTITUT PASTEUR. Établissement reconnu d'utilité publique,  
résidant en France.
- ⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1
- ⑦4 Mandataire : Cabinet Aymard, Anciennement Danzer et Aymard.
- ⑤4 Procédé de préparation de vaccins adsorbés.
- ⑦2 Invention de : Relyveld.
- ③3 ③2 ③1 Priorité conventionnelle :

La présente invention concerne un procédé perfectionné pour la préparation de vaccins adsorbés, notamment sur du gel de phosphate de calcium. Elle comprend les vaccins adsorbés par un nouveau gel de ce type.

- 5 On connaît les avantages des vaccins adsorbés. La forme concentrée, sous laquelle ils peuvent se trouver, présente l'avantage de n'exiger qu'un espace réduit pour leur stockage, alors qu'il est possible -à tout moment- de préparer, à partir de cette forme, de grandes quantités de vaccins en très peu de temps ; cela est
- 10 particulièrement précieux dans le cas des épidémies ou autres nécessités immédiates ; les préparations adsorbées, restant stables pendant plusieurs années, permettent de réduire considérablement les contrôles des produits de leur dilution, les titrages nécessaires ayant été effectués à partir des produits concentrés. Pour
- 15 ces raisons, les vaccins adsorbés ont fait l'objet de différents travaux qui n'ont pas tous abouti à des résultats satisfaisants ; en effet, la plupart des adsorbants essayés présentent l'inconvénient d'être irritants, de mal adsorber les antigènes ou d'être difficilement adaptables à l'échelle industrielle. Un certain pro-
- 20 grès a été réalisé par l'emploi d'un gel de phosphate de calcium préparé par la méthode connue de Tiselius, c'est-à-dire un gel formé de brushite, dont le phosphate est sous la forme de :  $\text{PO}_4\text{HCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Cependant, même sous cette forme, le gel n'adsorbe pas suffisamment d'antigène, dans tous les cas intéressants, et son
- 25 innocuité laisse quelquefois à désirer. Un autre perfectionnement a encore amélioré les vaccins adsorbés sur gel de phosphate de calcium, c'est celui qui fait l'objet du brevet belge n° 721 141, et qui consiste à précipiter le phosphate au sein d'un milieu contenant l'antigène.
- 30 La présente invention apporte un perfectionnement dans la préparation d'un gel de phosphate de calcium, qui se traduit par une amélioration considérable par rapport aux vaccins adsorbés, préparés jusqu'à présent. Elle permet d'obtenir des gels fortement adsorbants, pouvant conduire à des vaccins très concentrés et sta-
- 35 bles, dont l'injection ne donne lieu à aucune irritation ni complication. De plus, le nouveau gel de phosphate de calcium, suivant l'invention, peut être utilisé pour l'adsorption après sa préparation, et n'exige plus d'être formé au sein d'un milieu renfermant l'antigène, pour conserver ses bonnes qualités.

Le procédé pour la préparation d'un gel de phosphate de calcium, suivant l'invention, par mélange d'une solution de phosphate disodique et d'une solution de chlorure de calcium, aqueuses, est caractérisé en ce que la solution de chlorure de calcium est introduite très rapidement dans celle de phosphate disodique, continuellement agitée. Cette introduction doit être effectuée aussi vite que possible, en tous cas, en moins de 3 minutes.

L'invention résulte de la constatation surprenante que l'adjonction très rapide de sel de calcium conduit à un phosphate de calcium différent de la brushite et des phosphates dibasiques qui se forment, lorsqu'une solution aqueuse de chlorure de calcium est ajoutée progressivement, sous agitation, à une solution de phosphate disodique. En effet, le phosphate, constituant le gel suivant l'invention, présente une composition chimique plus voisine du phosphate tricalcique  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ , tandis que les phosphates, utilisés jusqu'à présent pour l'adsorption de vaccins, présentaient la composition de la brushite  $\text{PO}_4\text{HCa}$  ou voisine. Lorsque le mélange est effectué avec la grande rapidité prévue par l'invention, une partie des ions phosphoriques restent en solution, le précipité étant plus riche en calcium que ne le voudrait la théorie, même si les proportions de phosphate disodique et de chlorure de calcium de départ sont équimoléculaires.

La molarité des solutions mises en oeuvre, suivant l'invention, peut être avantageusement comprise entre 0,01 et 0,5, les valeurs préférées étant de 0,05 à 0,1. Dans ces limites, la solution aqueuse de chlorure de calcium peut avoir une concentration différente de celle du phosphate disodique, mais sa quantité est telle qu'on ait, dans le mélange final, sensiblement 1 mole de l'un pour 1 mole de l'autre des réactifs.

Bien que la durée d'adjonction du sel de calcium au phosphate disodique puisse atteindre environ 3 minutes, il est préférable qu'elle ne dépasse pas 1 minute. D'excellents résultats sont obtenus lorsqu'on opère avec des volumes tels qu'il soit possible de verser instantanément la solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  dans celle de phosphate disodique. Ainsi, avec des volumes de l'ordre de 50 l, il est possible de réaliser le mélange en l'espace de 2 à 30 secondes.

Un mode opératoire pratique consiste à mettre la solution de phosphate disodique dans un récipient ou bassine, muni d'un moyen

d'agitation, et à vider rapidement, dans ce récipient, le contenu d'un réservoir renfermant le volume correspondant de chlorure de calcium ; pendant cette opération, les moyens d'agitation sont en fonctionnement, et l'on continue à agiter lorsque l'introduction  
5 de  $\text{CaCl}_2$  est terminée. Des résultats particulièrement favorables sont obtenus par l'application d'un vibreur, mais l'agitation peut être également effectuée avec d'autres dispositifs, tels qu'un agitateur à palettes ou un turbo-mélangeur.

Une autre caractéristique importante du nouveau procédé ré-  
10 side dans un ajustement du pH du mélange obtenu, aussi rapidement que possible après l'addition du chlorure de calcium. A ce moment, le pH est amené à une valeur égale ou très voisine de 7, plus particulièrement 6,8 à 7,2, la marge de .7 à 7,2 étant préférable. Cet ajustement se fait à l'aide d'une solution de soude, dont la con-  
15 centration préférée se situe entre 0,1 N et 1 N.

Comme précisé plus haut, le réglage du pH doit suivre d'aussi près que possible l'introduction du  $\text{CaCl}_2$  dans la solution aqueuse de phosphate disodique ; pratiquement, il convient que ce réglage ait lieu dans moins de 10 minutes après la préparation du mélange.  
20 Pour avoir des meilleurs résultats, il est préférable que l'ajustement du pH soit immédiat, c'est-à-dire, qu'il ait lieu pendant les 30 à 90 secondes qui suivent la préparation du mélange.

Les opérations, décrites plus haut, sont effectuées à des températures pouvant varier entre 5° et 40°C ; pratiquement, elles  
25 peuvent être réalisées à la température ambiante.

Par la suite, on laisse reposer le mélange jusqu'à ce que le volume surnageant, clair, atteigne 80 à 90% du volume total. Ce repos peut avoir lieu à la température ordinaire ou en glacière et il dure, en général, 6 à 18 heures. Le liquide surnageant est  
30 alors décanté.

L'examen du gel obtenu et du liquide séparé montre que la totalité du calcium initial se retrouve dans le phosphate précipité, alors qu'une partie des ions  $\text{PO}_4$  restent en solution dans le liquide clair accompagnant le gel. Cette dernière caractéristique  
35 constitue un indice d'une précipitation conforme à la présente invention, conduisant au nouveau gel de phosphate voisin du phosphate tricalcique, qui présente les propriétés améliorées, exposées plus haut.

Le gel, après la décantation du liquide clair, est additionné

d'une solution de chlorure de sodium dans l'eau à 0,4% à 0,9%, le volume de cette solution étant du même ordre ou égal à celui du liquide décanté. Le tout est mélangé à l'aide d'un vibreur et laissé décanter à nouveau. La nouvelle couche du liquide surnageant, clair, est à son tour enlevée et remplacée encore par une solution semblable de chlorure de sodium. Cette opération est éventuellement répétée une troisième fois, pour parachever le lavage du gel.

La purification du gel de phosphate de calcium présente une grande importance. On s'est en effet aperçu que les ions phosphoriques, subsistant dans la solution, gênent l'adsorption de certains antigènes. Suivant la présente invention, l'adsorption est améliorée par l'élimination de ces ions. Cette élimination est avantageusement réalisée par le lavage susindiqué du gel, avec une solution saline ; de préférence, le lavage est effectué par dilution avec une solution aqueuse de NaCl, suivie d'une décantation ; l'opération est répétée plusieurs fois s'il y a lieu. Il est particulièrement recommandable d'utiliser une solution de NaCl contenant 4 à 9 g de ce sel par litre ; en effet, la dilution finale du vaccin avec une telle solution est favorable à l'action du vaccin.

Le gel final, ainsi lavé, contient généralement une quantité de phosphate telle que sa teneur en phosphore par litre est de 0,3 à 1,5 g et de préférence 0,7 à 0,85 g. L'analyse chimique globale conduit, pour le phosphate du gel, à une composition comprise entre celles des phosphates dicalcique et tricalcique ; on trouve, en effet, des rapports molaires  $\text{Ca}/\text{PO}_4$  variant entre 1,20 et 1,45, et surtout entre 1,25 et 1,38, ce qui correspond à des rapports pondéraux Ca/P de 1,55 à 1,90, et principalement 1,62 à 1,85 ; le rapport Ca/P en poids de la brushite,  $\text{PO}_4\text{CaH}_2\text{O}$  étant 1,29 et celui du  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  1,98, on voit que la composition globale du phosphate du gel suivant l'invention se situe au voisinage de  $\text{PO}_4\text{CaH}(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  dont le Ca/P est de 1,72 (rapport molaire  $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 1,33$ ).

Le gel obtenu est stérilisé en autoclave à 120°C pendant 1 heure, après quoi on rajuste le pH à 6,8-7,2, et de préférence dans la marge de 7 à 7,2, pour corriger la baisse du pH vers environ 6,5, qui se produit au cours de la stérilisation. Il est alors prêt à servir d'adsorbant de divers antigènes, à la manière con-

nue en soi. Il est bien entendu que le terme antigène, dans la présente description, comprend toutes sortes de substances de sécrétion microbienne, par exemple les anatoxines, ainsi que des micro-organismes entiers tels que bactéries, virus ou autres, ou certaines de leurs fractions.

On a constaté qu'avec les phosphates précipités conformément à l'invention, il est possible de faire adsorber au gel un ou plusieurs antigènes différents, même lorsque ce gel a déjà adsorbé précédemment un autre antigène. Ainsi, la présente invention comprend également la préparation de vaccins mixtes par addition d'un gel de phosphate de calcium, ayant adsorbé un certain antigène, à une solution contenant un ou plusieurs autres antigènes.

Si l'on applique les règles de précipitation suivant la présente invention, une ou plusieurs sortes d'antigènes peuvent se trouver dans le milieu de la précipitation, plus particulièrement dans la solution de phosphate disodique de départ ; on obtient alors d'emblée un gel renfermant des antigènes adsorbés. Après séparation des eaux mères et lavages, ce gel est capable d'adsorber encore d'autres antigènes ; il est donc possible d'obtenir des vaccins adsorbés mixtes par des opérations successives dont la première est une adsorption in situ, pendant la précipitation, et la seconde une adsorption sur gel déjà formé.

L'invention est illustrée non limitativement par les exemples qui suivent.

#### EXEMPLE 1

Préparation de vaccins adsorbés antipoliomyélitiques.

A 50 g d'une solution de phosphate disodique 0,07 M, agitée continuellement à l'aide d'un vibreur, on ajoute, en 28 secondes, 50 g d'une solution de chlorure de calcium 0,07 M ; le pH du mélange est ajusté à 7,1 avec une solution de soude normale, après l'addition du  $\text{CaCl}_2$ . Les 100 g de gel de phosphate de calcium, ainsi obtenu, sont laissés au repos jusqu'à la décantation de 85 g de liquide ; le liquide clair, surnageant, est séparé par siphonnage et remplacé par 85 g de solution aqueuse de NaCl à 4 g/l.

Un deuxième lavage est alors effectué par décantation du liquide salin et une nouvelle addition de 85 g d'eau à 4 g NaCl/l. Les 100 g de suspension obtenue sont stérilisés à 120°C, après quoi leur pH est ajusté à 7 ; on laisse reposer, et l'on décante en-



suite 85 l de liquide surnageant.

Aux 15 l de gel, restant au fond du récipient, on ajoute 100 l d'une solution aqueuse de vaccin antipoliomyélitique ; le mélange est agité pendant 30 minutes à l'aide d'un vibreur. On laisse alors  
5 reposer les 115 l de produit jusqu'à la décantation de 100 l de surnageant clair ; ce dernier est alors séparé, ce qui laisse 15 l de suspension de gel de phosphate de calcium ayant adsorbé le vaccin antipoliomyélitique.

A ce dernier volume, on ajoute une nouvelle portion de 100 l de  
10 solution de vaccin, le même que la première fois. Après vibration pendant 40 minutes, on effectue une nouvelle décantation de 100 l de liquide.

Aux 15 l de suspension de gel de phosphate chargé d'antigènes  
poliomyélitiques, restants après la décantation, on ajoute une  
15 troisième portion de 100 l de solution du même vaccin antipoliomyélitique que précédemment. Après une nouvelle vibration de 45 minutes, on laisse reposer et l'on décante 100 l de liquide surnageant, ce qui laisse 15 l de suspension de gel.

Ce dernier provient ainsi de 3 adsorptions successives de vaccin,  
20 et constitue un produit fortement concentré en ce dernier. Il est à noter qu'au cours des décantations sus-indiquées, le liquide surnageant était toujours inactif, ce qui prouve que le vaccin était complètement adsorbé.

Aux 15 l de suspension, finalement obtenue, on ajoute 85 l d'une  
25 solution de NaCl à 4 g/l, renfermant 25 p.p.m. d'hyamine. Le mélange est à nouveau agité à l'aide d'un vibreur ; on effectue, après repos, une décantation de 85 l de liquide ; aux 15 l du gel finalement obtenu on ajoute 85 l d'une solution à 4 g/l de NaCl renfermant 25 ppm d'hyamine. Le vaccin résultant est 3 fois plus concentré  
30 que le vaccin initial, et il est exempt des constituants du milieu de culture.

En ce qui concerne la teneur en phosphate de calcium, elle correspond, dans les 100 l de produit final, à 0,897 g/l de phosphore élémentaire et 1,5 g/l de calcium. Ainsi, le rapport pondéral  
35 Ca/P est de 1,68 (rapport atomique 1,292) dans le gel final, alors qu'on a utilisé, au départ, 1 mole de  $\text{CaCl}_2$  pour 1 de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  c'est-à-dire rapport Ca/P pondéral 1,29 (atomique : 1) ; en fait, tandis que la totalité de Ca a précipité, une partie de l'ion phosphorique est resté en solution, dans le liquide surnageant

éliminé ; on a trouvé notamment 0,31 g de P par litre de liquide clair de la première décantation.

#### EXEMPLE 2

Préparation d'un vaccin antirabique.

- 5 Les opérations sont celles de l'exemple 1, mais la solution de vaccin antipoliomyélitique est remplacée par une suspension virale obtenue par culture sur cerveau de mouton. On prépare d'abord par broyage ou tout autre procédé une suspension homogène du cerveau contenant le virus. Après la dernière décantation du
- 10 liquide surnageant, celui-ci est remplacé par une solution de chlorure de sodium à 9 g/ℓ.
- Des préparations similaires sont obtenues par la culture du virus au cerveau de souriceau ou par culture cellulaire.

#### EXEMPLE 3

- 15 Préparation d'un vaccin mixte.

On prépare d'abord une suspension de phosphate de calcium précipité in situ dans une solution contenant les vaccins antidiphtérique et antitétanique. On laisse reposer les 100 ℓ de suspension, ainsi obtenus, jusqu'à ce que les 4/5 du liquide soient

20 décantés, après quoi, on enlève le liquide clair surnageant. A la suspension du gel restante on ajoute 100 ℓ d'une solution de vaccin antipoliomyélitique, et le tout est agité pendant 30 minutes à l'aide d'un vibreur. On laisse ensuite reposer pour décanter, et l'on sépare à nouveau le liquide surnageant. Ensuite,

25 on ajoute un nouveau volume de 100 ℓ de solution de vaccin antipoliomyélitique, on agite de nouveau pendant une demi-heure et on laisse décanter, de façon à n'avoir plus finalement que 20 ℓ de produit (cette opération peut être répétée plusieurs fois), que l'on complète ensuite avec 80 ℓ de solution de NaCl à 4 g/ℓ

30 contenant 25 ppm d'hyamine.

#### EXEMPLE 4

Préparation d'un vaccin mixte.

- On prépare, suivant l'exemple 1, 25 ℓ de vaccin antidiphtérique, adsorbé sur du phosphate de calcium, 4 fois concentré,
- 35 25 ℓ de vaccin antitétanique de même type et concentration, et 25 ℓ de vaccin antipoliomyélitique similaire. On mélange les 3 volumes de 25 ℓ et on leur ajoute 25 ℓ de gel de phosphate de calcium obtenu comme à l'exemple 1. On a un vaccin mixte antidiphtérique-antitétanique-antipoliomyélitique adsorbé sur gel

de phosphate de calcium.

Dans une autre opération similaire, les 25 g de gel de phosphate sont remplacés par 25 g de vaccin anticoquelucheux, adsorbé sur phosphate de calcium, 4 fois concentré ; on obtient ainsi un vaccin mixte quadruple.

#### EXEMPLE 5

Mélange avec un vaccin lyophilisé.

Dans cette préparation, on emploie 50 g de suspension de gel ayant adsorbé les vaccins antidiphtérique et antitétanique, préparés selon un des exemples précédents, pour dissoudre un vaccin lyophilisé. Ce dernier est constitué par 50 000 doses de vaccin antirougeoleux atténué, lyophilisé. Après dissolution du vaccin lyophilisé, le mélange est prêt à l'injection.

#### EXEMPLE 6

Amélioration d'un vaccin antitétanique adsorbé.

Un vaccin antitétanique est préparé par l'adsorption au moyen d'un gel de phosphate de calcium formé in situ dans les conditions de l'exemple 1. Pour améliorer sa qualité, et éviter les réactions d'intolérance auxquelles il donne souvent lieu, on laisse reposer les 100 g de suspension jusqu'à décantation des 85% de son volume ; le liquide clair surnageant est alors siphonné et remplacé par une solution aqueuse de chlorure de sodium à 4 g/l, additionnée d'un antiseptique à dilution convenable. Cette opération est répétée une 2ème fois, et le vaccin ainsi obtenu ne donne plus aucune réaction secondaire.

#### EXEMPLE 7

Amélioration d'un vaccin anticoquelucheux.

Les vaccins anticoquelucheux contiennent souvent même après lavage des germes, des substances nocives qui s'adsorbent mal et qui, après injection dans l'organisme, peuvent causer des réactions secondaires. Ces substances nocives peuvent d'ailleurs être sécrétées par les germes, pendant le vieillissement du vaccin. Afin d'éviter ces inconvénients, on a lavé, de la façon suivante, le gel de phosphate de calcium ayant adsorbé du vaccin anticoquelucheux.

100 ml de suspension de ce vaccin adsorbé sont laissés en chambre froide pendant 48 heures. Tout le liquide clair surnageant est séparé et remplacé par une solution saline à 9 g NaCl par litre, contenant une dose convenable d'antiseptique. Le liquide surna-

geant, éliminé, jaunâtre, contenait les substances nocives ; son remplacement par la solution saline a rendu le vaccin beaucoup plus sûr et inoffensif.

Dans une autre préparation similaire, on a laissé la suspension initiale en chambre froide pendant 5 semaines ; c'est alors seulement que le traitement, décrit ci-dessus, a été effectué. De cette manière, le traitement a éliminé non seulement les substances nocives présentes dès le début, mais également celles que les microbes adsorbés ont secrétées pendant le vieillissement durant 5 semaines.

#### EXEMPLE 8

Quatre préparations de vaccin antidiphtérique sont effectuées dans les conditions analogues à celles de l'exemple 1, la solution de vaccin antipoliomyélitique étant remplacée par celle de l'anatoxine diphtérique. On opère, dans chaque cas, sur 1 litre de solution de phosphate disodique de concentration 0,07 M à 0,0735 M contenant l'anatoxine, et 1 litre de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,07 M à 0,0735 M. Cette dernière est versée dans la première, sous agitation, pendant un temps différent pour chacune des opérations A à D.

A ..... 10 secondes

B ..... 10 minutes

C ..... 20 minutes

D ..... 30 minutes

Après la précipitation du phosphate de calcium, le pH de la suspension aqueuse obtenue est mesuré, puis amené à la même valeur de 6,85 dans les quatre cas, par l'addition de NaOH N.

Les résultats des déterminations de la vitesse de décantation et de diverses analyses, effectuées sur les suspensions A à D, sont donnés ci-après.

Ajustement du pH des suspensions de phosphate de calcium.

TABLEAU I

Préparation	pH en fin de précipitation	ml NaOH N nécessaire, par litre de suspension pour amener le pH à 6,85
A	5,7	14,8
B	6,5	1,2
C	6,0	7,0
D	6,05	5,2

On voit que la suspension, obtenue par une précipitation extrêmement rapide (A), présente le pH le plus bas.

Décantation.

Après l'ajustement du pH, on détermine la vitesse de décantation sur 50 ml de chacune des suspensions A à D fraîchement ré-agitées. Ces mesures sont effectuées à 20°C dans des éprouvettes graduées de 50 ml, mesurant 125 mm de haut (2,5 mm de hauteur par ml de capacité). On trouve les hauteurs suivantes de liquide clair, décanté, après les temps indiqués au tableau II.

10

TABLEAU II

Temps	Hauteurs en mm de liquide décanté en fonction du temps			
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
5 minutes	2,5	48	48	57
15 10 minutes	3,8	82	83	89
20 minutes	6,3	92	91	95
1 h 15	21,2	100	95	105
17 heures	85,0	105	105	109

Il ressort de ces mesures que la vitesse de sédimentation de la suspension suivant l'invention (A) est beaucoup plus lente que celle des suspensions préparées à la manière classique (B,C;D), c'est-à-dire par addition progressive de  $\text{CaCl}_2$  à une solution de phosphate disodique. En gros, la décantation de la suspension A est environ 20 fois plus lente que celle des suspensions B, C ou D, durant les 10 premières minutes.

D'autres essais ont conduit à la constatation que les gels de phosphate de calcium présentent les qualités améliorées, suivant l'invention, lorsque leurs suspensions aqueuses, sensiblement 0,035 molaires (environ 1,4 g Ca/l et 1,08 g P/l), décantent de 1 à 20 mm, et de préférence de 2 à 10 mm, pendant les dix premières minutes à 20°C ; des vaccins particulièrement bien adsorbés et faciles à injecter sont obtenus avec des suspensions du type A ne décantant pas de plus de 6 mm en 10 minutes.

Les vitesses de sédimentation du gel A, du tableau II, n'ont pratiquement pas varié, après un ou deux lavages de ce gel, par décantation, avec une solution de 4 g NaCl par litre d'eau. Pouvoir adsorbant.

Les suspensions de gels A,B,C,D, ayant adsorbé de l'anatoxine diphtérique au cours de leur préparation décrite plus haut, ti-

trent chacune 120 unités de floculation (Uf) par ml. Après leur sédimentation, on détermine l'activité, par la méthode de floculation de Ramon, sur le liquide décanté, ce qui conduit aux résultats que voici :

5	A .....	0
	B .....	50 Uf/ml
	C .....	5 Uf/ml
	D .....	7,5 Uf/ml

Il est donc visible que les phosphates B, C et D laissent, dans leur milieu aqueux, de l'anatoxine non adsorbée (5 à 50 Uf/ml), tandis que le gel suivant l'invention adsorbe celle-ci intégralement.

D'autre part, le lavage du gel A par décantation avec une solution aqueuse à 4 g NaCl par litre ne fait apparaître de l'anatoxine dans la solution saline, ni après un, ni à la suite de deux lavages.

Teneurs en Ca et P des gels obtenus.

Des analyses des suspensions A à D entières, des liquides décantés, ainsi que des gels eux-mêmes, ont conduit aux résultats rassemblés au Tableau III ci-après. Dans ce tableau, les teneurs en Ca et P sont exprimées en g/litre : cela veut dire d'une part pour la suspension entière, agitée, telle qu'obtenue après la précipitation et ajustement du pH à 6,85 ; d'autre part, dans le liquide clair, séparé par décantation du phosphate précipité ; et enfin, dans une suspension ramenée à son volume initial par addition d'eau distillée, à la place du liquide décanté. Les rapports Ca/P au Tableau III sont pondéraux.

TABLEAU III

		<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
30	Durée d'addition de CaCl <sub>2</sub> pendant la précipitation	10 sec	10 mn	20 mn	30 mn
	Rapport Ca/P des réactifs utilisés	1,32	1,28	1,28	1,34
35	Suspension initiale entière	Ca 1,409 P 1,070	1,468 1,150	1,428 1,120	1,438 1,070
	Liquide décanté	Ca 0,026 P 0,315	0,068 0,117	0,040 0,197	0,046 0,172
	Gel séparé de son liquide et resuspendu dans l'eau	Ca 1,383 P 0,755	1,400 1,033	1,388 0,923	1,392 0,898
	Ca/P	1,83	1,35	1,51	1,55

Ces résultats démontrent que la précipitation très rapide (A) conduit à un milieu liquide renfermant moins de Ca et beaucoup plus d'ions phosphoriques que les liquides des précipitations classiques (B,C,D) ; par contre, le phosphate précipité est bien plus riche en calcium : rapport Ca/P = 1,83 contre 1,35 à 1,55. Bien que le phosphate D se rapproche, au point de vue de sa composition, de la limite inférieure (Ca/P = 1,55) de celui de l'invention, il en diffère cependant fortement par ses propriétés physico-chimiques : on a vu plus haut que sa décantation en 10 minutes est de 89 mm, soit 23,5 fois celle du gel A, ce qui est dû à une structure granulaire, préjudiciable à l'administration parentérale. On a vu également que le pouvoir d'adsorption du phosphate D laisse à désirer.

Lorsque le gel de phosphate A a subi deux lavages avec du NaCl à 4 g/l, à la manière décrite au début de l'exemple 1, et sa suspension a été ramenée au volume initial, on ne trouve plus que 0,06 g P/litre dans son liquide clair ; la teneur en Ca y est de 0,03 g/l. La concentration en ions phosphoriques, ainsi abaissée, n'est plus gênante, alors que le phosphate précipité a pratiquement la même composition qu'avant les lavages ; on trouve, en effet, un rapport pondéral Ca/P de 1,81 contre 1,83 avant lavages. Globalement, Ca/P = 1,8 correspondait à  $\text{PO}_4\text{CaH}.2(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ .

Bien que la concentration en phosphate dans les vaccins, suivant l'invention, puisse varier dans de larges limites, elle est pratiquement en général telle qu'il y ait 1 à 2 g de Ca et 0,56 à 1,43 g de P par litre. Cependant, et c'est là un des avantages de l'invention, le vaccin peut être conservé sous la forme d'un concentré stable, constitué par un gel de phosphate à environ 5 à 20 g de Ca et, respectivement, environ 2,8 à 14,3 g de P par litre.

REVENDICATIONS

1.- Procédé perfectionné pour la préparation d'un vaccin adsorbé sur un gel de phosphate de calcium, par la mise en contact d'un antigène avec un gel aqueux obtenu par la réaction entre du phosphate disodique et du chlorure de calcium, caractérisé en ce qu'une solution de chlorure de calcium dans l'eau est versée le plus rapidement possible, de préférence en moins de 3 minutes, dans une solution aqueuse de phosphate disodique agitée, et que, tout en continuant à agiter, on ajuste le pH du mélange, après la fin de l'addition du chlorure de calcium, à une valeur très voisine de 7, notamment 6,8 à 7,2, le gel obtenu étant ensuite décanté et lavé.

2.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que chacune des deux solutions mélangées a une teneur en le sel correspondant de 0,01 M à 0,5 M, et de préférence de 0,05 M et 0,1 M, les volumes respectifs de ces solutions étant tels qu'il y ait en présence sensiblement 1 mole de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  pour 1 mole de  $\text{CaCl}_2$ .

3.- Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'addition de chlorure de sodium est effectuée en l'espace de 2 à 30 secondes.

4.- Procédé suivant une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les opérations ont lieu à une température de 5° à 40°C.

5.- Procédé suivant une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le mélange réactionnel est laissé au repos jusqu'à ce que 80 à 90% de son volume total soit séparé en une couche surnageante de liquide clair qui est ensuite évacué, ces repos et évacuation étant de préférence répétées 2 à 4 fois.

6.- Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce que le liquide clair, évacué, est remplacé par une solution stérile de NaCl, de préférence à 4-9 g par litre.

7.- Procédé suivant une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'un ou plusieurs antigènes, en milieu aqueux, sont d'abord adsorbés par mélange avec le gel de phosphate de calcium, le gel résultant est lavé par dépôt, séparation du liquide surnageant, et remplacement de ce dernier par une solution saline, une ou plusieurs fois, et qu'ensuite un ou plusieurs antigènes d'une autre nature, également en milieu aqueux, sont adsorbés par le même gel renfermant déjà le ou les premiers antigènes, et le gel, ainsi



obtenu, est lavé.

- 8.- Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que la première adsorption a lieu par précipitation du phosphate de calcium au sein d'une solution de phosphate disodique contenant  
5 le ou les antigènes.

9.- Vaccin adsorbé sur du phosphate de calcium à l'état de gel aqueux, caractérisé en ce que le rapport entre le poids de calcium et celui de phosphore, combinés dans le phosphate, est de 1,55 à 1,90 et de préférence 1,62 à 1,85.

- 10 10.- Vaccin suivant la revendication 9, caractérisé en ce que sa teneur en Ca est d'environ 1 à 2 g/l et celle de P respectivement d'environ 0,56 à 1,43 g/l.

- 11.- Concentré de vaccin suivant la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il renferme environ 5 à 20 g de Ca et res-  
15 pectivement environ 2,8 à 14,3 g de P par litre.

12.- Gel aqueux de phosphate de calcium pour l'adsorption d'antigènes, caractérisé en ce que le calcium et le phosphore y contenus sont combinés dans les rapports pondéraux Ca/P de 1,55 à 1,90 et plus particulièrement de 1,62 à 1,85.

- 20 13.- Gel suivant la revendication 12, caractérisé en ce qu'il renferme 5 à 20 g de Ca pour 2,8 à 14,3 g de P par litre.

14.- Vaccin adsorbé, suivant la revendication 10, caractérisé en ce que la hauteur de son liquide qui décante en 10 minutes est de 1 à 20 mm à 20°C, et de préférence de 2 à 10 mm.

- 25 15.- Gel suivant la revendication 12, caractérisé en ce que la hauteur de son liquide qui décante en 10 minutes, à 20°C, est de 1 à 20 mm.